

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the U.S. Postal Service as Express Mail, Airbill No. EV 323 779 976 US, in an envelope addressed to: **MS Patent Application**, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date shown below.

Dated: December 30, 2003 Signature: _____

(Richard Zimmermann)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
APPLICATION FOR U.S. LETTERS PATENT

Title:

VERWENDUNG VON LIPOPEPTIDEN ODER LIPOPROTEINEN ZUR
WUNDBEHANDLUNG

(UTILIZATION OF LIPOPEPTIDES OR LIPOPROTEINS IN WOUND TREATMENT
AND INFECTION PROPHYLAXIS)

Inventors:

Peter Mühradt
Ursula Deiters

Nabeela R. McMillian
Registration No. 43,363
MARSHALL, GERSTEIN & BORUN LLP
233 S. Wacker Drive, Suite 6300
Sears Tower
Chicago, Illinois 60606-6357
(312) 474-6300

Verwendung von Lipopeptiden oder Lipoproteinen zur Wundbehandlung und Infektionsprophylaxe

Stand der Technik

Man kann 5 Stadien der Wundheilung beschreiben:

1. Blutgerinnung und Freisetzung von Mediatoren aus Thrombozyten (nach einigen Minuten),
2. Einstrom von Leukozyten, d. h. anfangs Granulozyten, später Makrophagen und Lymphozyten (Tag 1-3),
3. Vermehrung diverser Zellen wie Fibroblasten, Endo- und Epithelzellen (Tag 3-7),
4. Wundkontraktion (Tag 7-9) und
5. Umbau des Narbengewebes (bis zu einem Jahr)

Das Einströmen von Granulozyten in Phase 2 bewirkt Aufnahme von Debris und Abtöten von infektiösen Erregern, eine Aufgabe, die auch von Makrophagen übernommen wird. Die Makrophagen sind darüberhinaus die Quelle einer Reihe von Mediatoren wie Signalpeptiden, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie Transforming Growth Factor (TGF β 1), Platelet Derived Growth Factor (PDGF-AA und -BB), Fibroblast Growth Factor (FGF2) und zur Familie der Epidermal Growth Factors (EGF) gehörigem TGF- α . Makrophagen sezernieren auch Interleukin-1 (IL-1), das indirekt in Fibroblasten FGF7 induziert. Alle diese Faktoren sind an unterschiedlichen Stadien der Wundheilung beteiligt bzw. dafür unerlässlich. Ohne Makrophagen als Quelle dafür ist eine Wundheilung stark verzögert bzw. nicht möglich.

Problematik:

Obwohl es möglich ist, einige der oben erwähnten Mediatoren in isolierter Form bei der Wundheilung einzusetzen, ist dies jedoch ineffektiv, da die meisten dieser Peptide eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten haben. Weitere Schwierigkeiten bestehen darin, daß der natürliche Zeitpunkt des Erscheinens der unterschiedlichen Mediatoren, die optimale Dosierung und die Interaktion dieser Substanzen nicht im Einzelnen bekannt sind, geschweige denn bei Applikation kontrolliert werden können.

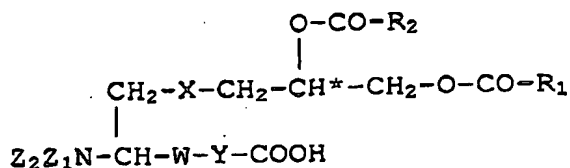
Eine Komplikation auch chirurgischer Wunden können Infektionen darstellen, die im allgemeinen zu verzögerter Wundheilung und erhöhter Narbenbildung führen, was besonders bei kosmetischen Operationen problematisch ist. Eine prophylaktische Abdeckung mit Antibiotika ist angesichts der Resistenzprobleme und eventueller allergischer Reaktionen vielerorts nicht mehr üblich. Bei bestimmten Patientengruppen, z. B. Diabetikern oder älteren Patienten, ist Wundheilung verzögert.

Lösung

Mykoplasmen haben natürlicherweise die Eigenschaft, am Infektionsort, z. B. der Lunge, zum Einströmen von Leukozyten zu führen. Wie wir jetzt zeigen konnten, ist diese Eigenschaft mit dem Vorhandensein einer bestimmten Klasse von Lipopeptiden assoziiert, die dadurch charakterisiert ist, daß sie N-terminal eine Dihydroxypropyl-cystein-Gruppe mit zwei esterartig gebundenen, langkettigen Fettsäuren aufweist (6, 10). Derartige Lipopeptide haben außer der bereits beschriebenen Eigenschaft, murine wie humane Makrophagen bzw. Monozyten in vitro zur Freisetzung von Zytokinen und Prostaglandinen zu stimulieren (1 bis 3; 11), auch die von uns neu gefundene Fähigkeit, in vivo hohe Titer an den Chemokinen MIP-1 α , MIP-2, MCP-1 und KC zu induzieren und Leukozyteneinwanderung zu bewirken (12). Diese Lipopeptide stimulieren die Zellen über den "toll-like receptor 2" (13).

In der Tier- wie Humanmedizin können reine, synthetisch hergestellte Lipopeptide sowie Lipopeptide, die in Liposomen eingebaut oder an biologisch abbaubare polymere Trägersubstanzen gekoppelt sind, z. B. in Form von Salben, Lotionen oder Injektionslösungen eingesetzt werden. Auf Wunden aufgebracht oder in Wundnähe injiziert sollen derartige Präparate den natürlichen Einstrom von Granulozyten und Makrophagen erhöhen und beschleunigen und somit einer Infektion vorbeugen sowie durch Anregung der Biosynthese an der Wundheilung beteiligter Mediatoren in der natürlichen Reihenfolge und Konzentration die Wundheilung erleichtern und beschleunigen. Die in vivo-Wirksamkeit derartiger Lipopeptide aus Mykoplasmen ist überraschend und neu, da die Applikation von anderen bakteriellen Lipopeptiden und ihrer synthetischen Analoga im Tierversuch keine Wirkung zeigen (8).

Gemäß einer Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch die Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins mit der folgenden allgemeinen Struktur:



in der

R₁ und R₂, die gleich oder voneinander verschieden sein können, für C₇₋₂₅-Alkyl, C₇₋₂₅-Alkenyl oder C₇₋₂₅-Alkynyl,

X für S, O oder CH₂,

Z₁ und Z₂, die gleich oder voneinander verschieden sein können, für H oder Methyl,

W für CO oder S(O)_n (mit n = 1 oder 2) und

Y für eine aus 1 bis 25 Aminosäureresten bestehende physiologisch verträgliche Aminosäuresequenz stehen und das mit * markierte asymmetrische Kohlenstoffatom die absolute S-Konfiguration hat, wenn X = S (Schwefel) ist, zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Tier- oder Humanwundbehandlung gelöst.

Erfindungsgemäß kann das Lipopeptid oder Lipoprotein dadurch gekennzeichnet sein, daß Y für eine aus 1 bis 25 Aminosäuren bestehende physiologisch verträgliche Aminosäuresequenz steht.

Erfindungsgemäß kann das Lipopeptid oder Lipoprotein dadurch gekennzeichnet sein, daß Y für eine Aminosäuresequenz steht, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

- (i) Aminosäuresequenz, die die Wasserlöslichkeit des Lipopeptids oder Lipoproteins nicht beeinträchtigt.

- (ii) GQTNT
- (iii) SKKKK
- (iv) GNNDESNI\$FKEK
- (v) GQTDNNS\$SQOPGSGTTNT

wobei bei den Aminosäuresequenzen (ii), (iii), (iv) und (v) einzelne Aminosäuren fehlen oder ausgetauscht sein können.

Erfindungsgemäß können das C₇₋₂₅-Alkyl, C₇₋₂₅-Alkenyl oder C₇₋₂₅-Alkynyl ein C₁₅-Alkyl, C₁₅-Alkenyl oder C₁₅-Alkynyl sein.

Erfindungsgemäß kann in dem C₇₋₂₅-Alkenylrest die Doppelbindung(en) die cis-Konfiguration aufweisen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch die Verwendung eines physiologisch verträglichen Lipopeptids oder Lipoproteins, das N-terminal eine Dihydroxypropyl-cystein-Gruppe mit zwei esterartig gebundenen gegebenenfalls langkettigen Fettsäuren trägt, die gleich oder verschieden sind, zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Tier- und Humanwundbehandlung gelöst.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins, erhältlich aus einem Mykoplasma-Klon, zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Tier- oder Humanwundbehandlung.

Diese Verwendung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß das Lipopeptid oder Lipoprotein aus einem Mykoplasma-fermentans-Klon erhältlich ist.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung kann das Lipopeptid oder Lipoprotein wasserlöslich oder amphoter sein.

Erfindungsgemäß kann ein Lipopeptid oder Lipoprotein aus der folgenden Gruppe verwendet werden:

- (i) S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2RS)-propyl]cysteinyl-GQTNT
- (ii) S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2RS)-propyl]cysteinyl-SKKKK
- (iii) S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2RS)-propyl]cysteinyl-GNNDESNI⁸FKKK
- (iv) S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2S)-propyl]cysteinyl-GNNDESNI⁸FKKK
- (v) S-[2,3-Bispalmitoyloxypropyl]cysteinyl-GQTDNNSSQSQPGSGTTNT

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung kann das Lipopeptid oder Lipoprotein in Form einer Lösung zur epikutanen Anwendung, einer Injektionslösung, einer Salbe, einer Lotion, einer wäßrigen Suspension, eines damit imprägnierten oder beschichteten Pflasters, in Liposomen verkapselt oder an biologisch abbaubare Trägerpolymere gekoppelt vorliegen.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung kann es sich bei den Wunden um Wunden nach Verletzungen oder chirurgischen Eingriffen, um chronisch infizierte Wunden, Brandwunden, chronische Ulcera oder Ulcus venosum oder Wunden von Patienten handeln, die korpulent oder Diabetiker sind oder einer Strahlen- oder Chemotherapie unterzogen worden sind.

Synthetische Lipopeptidpräparate wären kostengünstig herstellbar und würden den natürlichen Ablauf der Wundheilung verstärken,

ohne prinzipiell in den komplizierten Regelmechanismus verschiedener Mediatoren der Wundheilung einzugreifen. Darüberhinaus würde eine Infektionsprophylaxe bewirkt, ohne daß Antibiotika oder andere, die Wundheilung z. B. schädigende Bakteriostatika eingesetzt werden müssten. Solche Lipopeptidpräparate wären auch bei Gesichtswunden einsetzbar, bei denen aus Gründen der Toxizität der üblichen Bakteriostatika bei Gefahr des Kontakts mit Augen oder dem Nasen- und Oralbereich Vorsicht geboten ist. Bei topischer Anwendung ist die Gefahr von systemischen Wirkungen wie Fieber so gut wie ausgeschlossen.

Nachstehend wird die Erfindung durch Abbildungen und Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1: Makrophagen-Aktivierung durch synthetische Lipopeptide, die sich von Mykoplasmen herleiten, gemessen mit dem Stickstoffmonoxid-Freisetzungs-Assay.

Ein leicht quantifizierbarer Assay zur Aktivierung von murinen Makrophagen mit Lipopeptiden stellt die Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus peritonealen Exsudat-Zellen in Gegenwart von Interferon- γ dar; vgl. beispielsweise Mühlradt & Frisch in 2. Dieser Assay wird mit peritonealen Exsudat-Zellen von C3H/HeJ-Mäusen, die nur schwach mit Endotoxin reagieren, in Mikrotiterplatten (96 Tröge) durchgeführt. 10^5 Zellen werden gleichzeitig mit rIFN- γ und einer seriellen Verdünnung eines Makrophagen aktivierenden Materials stimuliert. Nach einer 48-stündigen Inkubationsdauer wird das Nitrat mit Nitratreduktase reduziert; NO wird als Summe von Nitrit und Nitrat mit dem Griess-Reagenz bestimmt.

Die Makrophagen-Stimulationswirkung der folgenden Lipopeptide wird in den Figuren 1A bis 1D verglichen.

Fig. 1A: MALP-A:S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2RS)-propyl]cysteinyl-SKKKK.

Fig. 1B: N-Palmitoyloxy-MALP-A:S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2RS)-propyl]-N-palmitoylcysteinyl-SKKKK.

Fig. 1C: MALP-H: S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2RS)-propyl]-cysteinyl-GQTNT.

Fig. 1D: S-MALP-2: S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2S)-propyl]-cysteinyl-GNNDESNISFKEK; und R-MALP-2: S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2R)-propyl]cysteinyl-GNNDESNISFKEK.

Mit Hilfe dieses Assays wird damit gezeigt, daß die Länge oder Zusammensetzung des Peptid-Anteils der Lipopeptide von geringem Einfluß auf die Makrophagen-Stimulationsaktivität ist (vgl. Fig. 1A, 1C und 1D), während die Anzahl der Fettsäuren am N-terminus (vgl. Fig. 1A und 1B) und insbesondere die Stereo-konfiguration an der 2-Stellung der Diacyloxypropyl-Gruppe von Einfluß ist (vgl. Fig. 1D).

Beispiel 2:

Als Beispiel der Wirksamkeit von synthetischen Lipopeptiden oder Liposomen, in die derartige Lipopeptide inkorporiert wurden, dient uns das Modell des Einströmens von Granulozyten und Makrophagen in den Peritonealraum der Maus. Es werden NMRI-Auszucht-mäuse als Versuchstiere verwendet, um genetische Besonderheiten auszuschließen.

Das racemische Lipopeptid MALP-2 wurde gemäß Mühlradt et al. in (6) synthetisiert, die Verbindungen R-MALP-2 = S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2R)-propyl]cysteiny-GNNDENISFKEK bzw. S-MALP-2 = S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2S)-propyl]cysteiny-GNNDENISFKEK nach Zitat 7. MALP-haltige Liposomen werden wie folgt konstruiert: Die in Chloroform bzw. Chloroform/Methanol (1+1) gelösten Lipide (Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin, Cholesterol, NBD-PE, molares Verhältnis 1,08 : 1 : 0,25 : 0,005) werden mit dem in 2-Propanol/H₂O (1+1) gelösten MALP-2 zusammenpipettiert und mittels Rotationsverdampfer eingeeengt. Vollständige Trocknung des Lipidfilms erfolgt über Nacht unter der Sterilbank. Auflösen des getrockneten Lipidfilms in Octylglucosid (100 mM in 0,05 M Tris-gepuffertem NaCl, pH 7), 30 min. bei 37 °C im Wasserbad. Dialyse gegen das 50-fache Volumen NaCl (0,1 M Tris-gepuffert, pH 7) bei Raumtemperatur, 2 x Wechsel des Außendialysats nach jeweils 24 Stunden.

Die erhaltene Liposomensuspension wird insgesamt 3 x mit NaCl gewaschen (Zentrifugation 30 min. bei 47800 g, 4 °C) und im Anschluß daran in NaCl resuspendiert.

Zum Zeitpunkt 0 werden die folgenden Präparate steril und in physiologischer Kochsalzlösung in den Bauchraum der Versuchstiere injiziert. Gruppen von 6 Mäusen werden nach unterschiedlichen Zeiten getötet, der Bauchraum mit 1,2 ml steriler Kochsalzlösung gespült und die Leukozytenzahl und -zusammensetzung dieser Zellsuspension bestimmt.

Fig. 2 zeigt den Einstrom von Gesamtleukozyten bzw. Granulozyten als Reaktion auf die intraperitoneale Injektion von 9 µg racemischem MALP-2 in NMRI-Mäuse (Gruppen von 6 Tieren).

Fig. 3 zeigt den Einstrom von Gesamtleukozyten bzw. Granulozyten als Reaktion auf die intraperitoneale Injektion von 0.2 mg Liposomen, die 9 µg racemisches MALP-2 enthielten, in NMRI-Mäuse (Gruppen von 6 Tieren).

Fig. 4 zeigt den Einstrom von Gesamtleukozyten bzw. Granulozyten als Reaktion auf die intraperitoneale Injektion von 0.2 mg Kontroll-Liposomen, die kein MALP-2 enthielten, in NMRI-Mäuse (Gruppen von 6 Tieren).

Fig. 5A zeigt die Infiltration von Leukozyten in die Rückenhaut einer NMRI-Maus, 3 Tage nach intrakutaner Injektion von 2 µg S-MALP-2, das in Liposomen inkorporiert war.

Fig. 5B zeigt im Vergleich: Rückenhaut einer unbehandelten Maus.

Fig. 6 zeigt den Bereich des nach MALP-Injektion entstandenen neuen Gewebes mit neuen Gefäßen (Bildmitte).

In der Tabelle 1 sind die wesentlichen Werte, d. h. der nach Injektion der Präparate erfolgende Anstieg an Granulozyten und der spätere Anstieg an Makrophagen zusammengefaßt. Es ergibt sich eine Zunahme gegenüber unbehandelten Kontrolltieren von Granulozyten um das etwa Hundertfache, während die Makrophagen nach 3 Tagen um das Doppelte bis Dreifache zugenommen haben.

Misst man 2 Std. nach Applikation der Mykoplasmen oder Lipopeptidpräparate die chemotaktisch wirksamen Chemokine MIP-1α, MIP-2 oder KC im Serum der Versuchstiere, so findet man signifikant erhöhte Aktivitäten.

Beispiel 3:

Die Bedeutung des asymmetrischen C-Atoms an C2 der Dihydroxypropylgruppe für die in-vivo-Wirkung zeigt die Tabelle 2. Hier wurden wie oben Gruppen von 5 NMRI-Mäusen unterschiedliche Mengen R-MALP-2 = S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2R)-propyl]cysteinyl-GNNDENISFKEK bzw. S-MALP-2 = S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2S)-propyl]cysteinyl-GNNDENISFKEK intraperitoneal appliziert und nach 3 Tagen die Gesamtzahl sowie Zusammensetzung der Peritonealleukozyten bestimmt. Das S-MALP-2 ist deutlich wirksamer.

Beispiel 4:

Um die Wirkung des MALP-2 bei intrakutaner Applikation zu zeigen, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Injiziert man 2 µg freies S-MALP oder 2 µg S-MALP in 0,1 mg Liposomen inkorporiert intrakutan in die Haut von NMRI-Mäusen, so bildet sich nach 3 Tagen an der Injektionsstelle eine deutliche Ansammlung von Leukozyten (vgl. Abb. 5A und 5B), bzw. nach 6 Tagen bilden sich neues Gewebe und Gefäße (Abb. 6). Dies zeigt, daß die Präparate in der Haut wirksam sind und in der Lage sind, die Wundheilung zu fördern.

Beispiel 5: Effekte einer topischen Anwendung von S-MALP-2 auf Zelleinwanderung und Wundheilung bei Mäusen.

Um eine Dosisantwort zu etablieren, wurden zwei Arten von Experimenten durchgeführt:

1. Bestimmung der Zelleinwanderung und Proliferation durch Messung von Nucleinsäuren in Hautstanzen nach intrakutaner (ic) Injektion verschiedener MALP-2-Dosen. Am Tag -1 wurden die Rücken von C57BLKS/J Mäusen geschoren und mit "Veet" enthaart.

Am Tag 0 wurden die Tiere mit Metofane betäubt; es wurden verschiedene Dosen von MALP-2, gelöst in 30-proz. 2-Propanol in Volumina von bis zu 10 μ l in die Rücken injiziert (ic). Entsprechende Volumina des Vehikels ohne MALP-2 wurden in die Rücken derselben Mäuse an anderer Stelle injiziert. Die Tiere wurden 10 Tage später getötet; es wurden Hautstanzen (Durchmesser 0.8 cm) von den MALP-2-Injektionsstellen und den Kontrollinjektionsstellen entnommen. Die Hautbiopsien wurden durch eine 15-minütige Extraktion mit Methanol, Methanol/Chloroform (1+1) und Chloroform entfettet und in 10 N HCl über Nacht bei 110 °C hydrolysiert. Die Proben wurden getrocknet, in Wasser aufgenommen, durch Filtration durch Sterilfilter (0.2 μ m) geklärt; die Nukleinsäuren wurden durch Messen der Absorption bei 260 nm gemessen. 5 μ g MALP-2 pro Injektionsstelle erwiesen sich als optimal. Bei dieser Dosis erhöhte sich der Nukleinsäure-Gehalt der MALP-2-Injektionsstelle um 97 ± 43 % gegenüber der entsprechenden Kontrollbiopsie (4 Tiere pro Gruppe).

2. Zellbesiedelung und -Proliferation wurden in Hautstanzen (0.8 cm Durchmesser) von Wunden gemessen, die mit verschiedenen Mengen an MALP-2 behandelt worden waren. Für dieses Experiment wurden (C57BLKS/J-m⁺/+Lepr^{db}-Mäuse (diabetisch) auf den Rücken geschoren und mit "Veet" enthaart. Die Tiere wurden mit Metofane betäubt und ihre Rücken wurden mit Braunol desinfiziert. Danach wurden kreisförmige Hautsegmente (0.8 cm Durchmesser) auf dem Rücken jeder Maus herausgestanzt. Die Wunden wurden mit transparentem Hydrofilm (Hartmann, Deutschland) abgedeckt; MALP-2 oder Vehikel wurden in Volumina von 50 μ l durch den Film in das Wundbett injiziert. Nach 10 Tagen wurden die Tiere getötet; die dünne Schicht Zellen, die die Wunde verschloß, wurde ausgestanzt (0,8 mm Durchmesser). Die ausgestanzten Proben wurden hydrolysiert und die Nucleinsäure wurde wie zuvor bestimmt. Auch bei diesem Modell war eine Dosis von 5 μ g MALP-2 pro Wunde optimal.

Bei dieser Dosis wurden 349 ± 24 μ g Nucleinsäure pro Biopsie-Probe aus den mit MALP-2 behandelten Tieren gemessen, während 142 ± 22 μ g bei den Vergleichsproben ermittelt wurden (4 Tiere pro Gruppe; $P < 0.0001$).

Ein Wundheilungs-Experiment wurde folgendermaßen durchgeführt. Am Tag -1 wurden C57BLKS/J-m+/+Lepr^{db} Mäuse (diabetisch) auf ihren Rücken geschoren. Am Tag 0 wurden die Tiere mit Ether betäubt, und die Rücken wurden mit Braunoderm desinfiziert. Danach wurden kreisförmige Bereiche (1.3 cm Durchmesser) aus der Rückenhaut jeder Maus herausgeschnitten. Die Wundränder wurden mit Benzoin-Tinktur behandelt; es wurden 100 μ l der MALP-2-Zubereitung oder des Vehikels in jede Wunde gegeben (10 Mäuse für jede Behandlungsgruppe). Die Wunden wurden mit durchsichtigen Pflastern von Tegaderm abgedeckt. Jeden Tag bis zum Tag 4 wurden 100 μ l der Zubereitung (Gehalt 5 μ g MALP-2) oder Vehikel-Zubereitung durch den Tegaderm-Verband in das Wundbett injiziert oder in der Wunde platziert, wenn der Verband gewechselt wurde. Die Mäuse wurden einzeln in separaten Käfigen gehalten. Um Infektionen zu vermeiden, wurde Baytril (Bayer) in das Trinkwasser gegeben (50 mg/l Enrofloxacin). Die Verbände wurden unter kurzer Ether-Anästhesie einmal pro Woche gewechselt, wobei die Wundränder auf Objektträgern abgezeichnet wurden. Die abgezeichneten Bereiche wurden mit einer Standard-CCD-Kamera und ScionImage-Software bestimmt. Die Wunden wurden visuell auf Infektionen geprüft; Flüssigkeitsproben von offensichtlich infizierten Wunden wurden auf Blutagar-Platten getestet. Mäuse mit infizierten Wunden wurden von weiteren Analysen ausgenommen. Die Daten finden sich in Fig. 7 und zeigen eine signifikante Beschleunigung der Wundheilung bei den mit S-MALP-2 behandelten Tieren.

Beispiel 6: Erhöhung der Überlebensrate von Mäusen in einem Peritonitis-Modell durch MALP-2-Vorbehandlung.

"Colon ascendens stent peritonitis" ist ein neues Modell für abdominale Sepsis, die auf einen chirurgischen Eingriff folgen kann (9). Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um die Fähigkeit von MALP-2 zu bewerten, die Überlebensrate in diesem Modell zu verbessern. Es wurden Gruppen von 12 bis 18 C57BL/6-Mäusen intraperitoneal 2 µg S-MALP-2 in 200 µl physiologischer Kochsalzlösung oder dieselben Volumina physiologischer Kochsalzlösung entweder 2 oder 4 Tage vor dem chirurgischen Eingriff injiziert. Der chirurgische Eingriff wurde unter Ether-Betäubung durchgeführt. Das Abdomen wurde mit 70 proz. Ethanol desinfiziert, und dann durch einen Einschnitt in der Mittellinie (1 cm) geöffnet. Es wurde ein Venenkatheter (16 gauge) in das Lumen des absteigenden Kolons eingesetzt und mit zwei Stichen eines Ethilon-Fadens (7/0) befestigt. Danach wurde die innere Nadel des Stents entfernt, der Katheter auf eine Länge von wenigen mm gekürzt und ein kleiner Tropfen Kot aus dem Katheter ausgepreßt. Der Peritonealraum wurde mit 0,5 ml Kochsalzlösung vor dem Verschließen des Abdomens gespült. Von den Mäusen mit Kochsalzlösung-Kontrolle (18 pro Gruppe) überlebte keine länger als 90 h. Von den zwei Tage vor dem chirurgischen Eingriff mit MALP-2 behandelten Tieren überlebten 4 von 12 150 h oder länger, während von den vier Tage vor dem chirurgischen Eingriff mit MALP-2 behandelten Tieren 6 von zwölf 120 Stunden und länger überlebten. Der Unterschied in der Überlebensrate war statistisch signifikant ($P < 0.001$ nach dem log-Rank-Test).

Referierter Stand der Technik

1. Quentmeier et al. in Infect. Immun., 58 (1990) 1273-1280,
2. Mühlradt & Frisch in Infect. Immun., 62 (1994) 3801-3807.
3. Mühlradt & Schade in Infect. Immun., 59 (1991) 3969-3974.
4. Metzger et al. in Int. J. Pep. Protein Res., 38 (1991) 545-554.
5. Metzger et al. in J. Pept. Sci., 3 (1995) 184-190.
6. Mühlradt et al. in J. Exp. Med., 185 (1997) 1951-1958
7. Metzger et al. in J. Medicinal Chem., 34 (1991) 1969-1974.
8. Hausschild et al. in FEMS Immunol. Med. Microbiol., 8 (1994) 77.
9. Zantl et al. in Infekt. Immun., 66 (1998) 2300-2309
10. Mühlradt et al. in Infect. Immun., 66 (1998) 4804
11. Kaufmann et al., in Infect. Immun., 67 (1999) 6303
12. Deiters & Mühlradt in Infect. Immun., 67 (1999) 3390
13. Takeuchi et al. in J. Immunol., 164 (2000) 554

Tabelle 1. Leukozyten Einstrom als Folge der intraperitonealen Injektion von racemischem MALP-2 nach 72 Std.

Behandlung	Peritonealzellen	Monozyten + Makrophagen	
	($\times 10^6$)	($\times 10^6$)	(%)
MALP-2 (9 μ g)	11.2 ± 3.1^b	5 ± 1.2^b	47.4 ± 15.2
Liposom-encapsuliertes MALP-2 (9 μ g)	8.5 ± 1.2^c	4.9 ± 0.9^c	57.6 ± 8.1^c
Kontroll Liposomen	6.4 ± 1.9	2.9 ± 1.2	44.5 ± 6.8
NaCl (0.9 %)	5.8 ± 0.5	2.8 ± 0.4	47.9 ± 1.7

(2. Seite der Tabelle 1)

Lymphozyten		Granulozyten	
($\times 10^6$)	(%)	($\times 10^6$)	(%)
3.5 ± 1.2	32 ± 11^b	2.6 ± 2.7	20.2 ± 13.2^b
2.9 ± 1	33.4 ± 9^c	0.8 ± 0.2^c	9.7 ± 2.2^c
3.2 ± 0.9	51.8 ± 6.7	0.2 ± 0.08	2.9 ± 1.4
2.8 ± 0.2	48.8 ± 1	0.05 ± 0.03	0.9 ± 0.6

Es wurden Gruppen von 6 Tieren verwendet.

^b Signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$) gegenüber Kochsalz behandelten Kontrolltieren
(nach Student's t-test)

^c Signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$) gegenüber Tieren, die Kontroll Liposomen erhielten
(nach Student's t-test)

Tabelle 2: Leukozyten Einstrom 72 Stunden nach intraperitonealer Injektion von R-MALP-2 bzw. S-MALP-2

		PEC	Makrophagen		Lymphozyten	
		(x 10 ⁶)	(x 10 ⁶)	%	(x 10 ⁶)	%
Kontr.	A	5,4	2,9	54	2,2	40,7
	B	6,4	3,8	58,6	2,4	38,1
	C	7,95	4,1	52,6	3,4	43,1
	D	7,5	2,9	38,5	4,4	57,9
	E	5,1	2,7	53,4	2,2	44
	o	6,5 ± 1,3	3,3 ± 0,6	51,4 ± 7,6	2,9 ± 0,9	44,8 ± 7,7
R-MALP (10 µg)	A	11,1	4,5	40,1	6,3	56,5
	B	4,05	2,1	52,4	1,8	45,2
	C	11,4	6	53	5	44,2
	D	7,65	4	52,6	3,4	44,4
	E	9	4,6	51,3	4,1	45,6
	o	8,64 ± 3	4,2 ± 1,4	49,9 ± 5,5	4,1 ± 1,7	47,2 ± 5,2
S-MALP (1 µg)	A	9,1	4,5	49,9	4,2	46,3
	B	10,8	4,7	43,8	5,2	48,3
	C	9,35	5,3	56,9	2,6	27,8
	D	13,7	8,4	61,6	4	29,4
	E	7,9	4,6	58,5	2,8	34,9
	o	10,2 ± 2,2 ^a	5,5 ± 1,7 ^a	54,1 ± 7,2	3,8 ± 1,1	37,3 ± 9,5
S-MALP (5 µg)	A	14,4	6,3	44,1	5,1	35,2
	B	15,2	5,6	37,2	5,4	35,5
	C	17,3	6,1	34,8	10	58,1
	D	13,1	5,4	41,5	2,8	21,5
	E	12,5	6,3	50,7	4,2	33,4
	o	14,5 ± 1,9 ^{ab}	5,9 ± 0,4 ^{ab}	41,7 ± 6,2	5,5 ± 2,7	36,7 ± 13,3

^a Signifikante Abweichungen zu den Kontrolltieren (ohne Injektion);

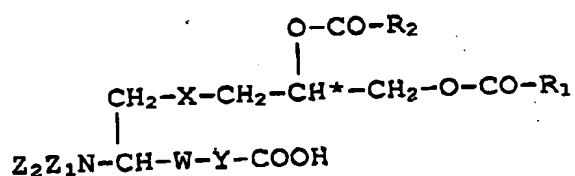
^b Signifikante Abweichungen zu den mit R-MALP (10 µg) behandelten Tieren

(2. Seite der Tabelle 2)

Neutrophile	
($\times 10^5$)	%
0	0
0,19	0,3
0,24	0,3
0	0
0	0
$0,09 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,16$
0,56	0,5
0,32	0,8
0,34	0,3
0	0
0,27	0,3
$0,3 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,3$
0,46	0,5
3	2,8
12	12,8
10,1	7,4
2,8	3,5
$14,8 \pm$	$5,4 \pm 4,8^{a,b}$
$17,9^{a,b}$	
25,9	18
41	27
8,1	4,7
45,5	34,7
17,3	13,8
$27,6 \pm$	$19,6 \pm 11,6^{a,b}$
$15,7^{a,b}$	

Patentansprüche 1 bis 12

1. Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins mit der folgenden allgemeinen Struktur:



in der

R₁ und R₂, die gleich oder voneinander verschieden sein können, für C₇₋₂₅-Alkyl, C₇₋₂₅-Alkenyl oder C₇₋₂₅-Alkinyl,

X für S, O oder CH₂,

Z₁ und Z₂, die gleich oder voneinander verschieden sein können, für H oder Methyl,

W für CO oder S(O)_n (mit n = 1 oder 2) und

Y für eine aus 1 bis 25 Aminosäureresten bestehende physiolo-

gisch verträgliche Aminosäuresequenz stehen und das mit * markierte asymmetrische Kohlenstoffatom die absolute S-Konfiguration hat, wenn X = S (Schwefel) ist, zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Tier- oder Humanwundbehandlung.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Y für eine aus 1 bis 25 Aminosäuren bestehende physiologisch verträgliche Aminosäuresequenz steht.
3. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Y für eine Aminosäuresequenz steht, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:
 - (i) Aminosäuresequenz, die die Wasserlöslichkeit des Lipopeptids oder Lipoproteins nicht beeinträchtigt.
 - (ii) GQTNT
 - (iii) SKKKK
 - (iv) GNNDESNI SFKEK
 - (v) GQTDNNSQSQQPGSGTTNT

wobei bei den Aminosäuresequenzen (ii), (iii), (iv) und (v) einzelne Aminosäuren fehlen oder ausgetauscht sein können.
4. Verwendung nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das C₇₋₂₅-Alkyl, C₇₋₂₅-Alkenyl oder C₇₋₂₅-Alkinyl ein C₁₅-Alkyl, C₁₅-Alkenyl oder C₁₅-Alkinyl ist.
5. Verwendung nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei in dem C₇₋₂₅-Alkenylrest die Doppelbindung(en) die cis-Konfiguration aufweisen.

6. Verwendung eines physiologisch verträglichen Lipopeptids oder Lipoproteins, das N-terminal eine Dihydroxypropyl-cystein-Gruppe mit 2 esterartig gebundenen, gegebenenfalls langket-tigen Fettsäuren trägt, die gleich oder verschieden sind, zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Tier- oder Human-Wundbehandlung.
7. Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins, erhältlich aus einem Mykoplasma-Klon zur Tier- oder Human-Wundbehand-lung.
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Lipopeptid oder Lipoprotein aus einem Mykoplasma-fermentans-Klon erhältlich ist.
9. Verwendung nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Li-popeptid oder Lipoprotein wasserlöslich oder amphoter ist.
10. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche eines Li-popeptids oder Lipoproteins ausgewählt aus der Gruppe
 - (i) S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2RS)-propyl]cysteinyl-GQTNT
 - (ii) S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2RS)-propyl]cysteinyl-SKKKK
 - (iii) S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2RS)-propyl]cysteinyl-GNNDESNI SFKEK
 - (iv) S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2S)-propyl]cysteinyl-GNNDESNI SFKEK
 - (v) S-[2,3-Bispalmitoyloxypropyl]cysteinyl-GQTDNNSSQSQPGSGTTNT

11. Verwendung nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Lipopeptid oder Lipoprotein in Form einer Lösung zur epikutanen Anwendung, einer Injektionslösung, einer Salbe, einer Lotion, einer wäßrigen Suspension, eines damit imprägnierten oder beschichteten Pflasters, in Liposomen verkapselt oder an biologisch abbaubare Trägerpolymere gekoppelt vorliegen kann.
12. Verwendung nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei es sich bei den Wunden um Wunden nach Verletzungen oder chirurgischen Eingriffen, um chronisch infizierte Wunden, Brandwunden, chronische Ulcera oder Ulcus venosum oder Wunden von Patienten handelt, die korpulent oder Diabetiker sind oder einer Strahlen- oder Chemotherapie unterzogen worden sind.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Präparat zur Tier- oder Human-Wundbehandlung enthaltend ein oder bestehend aus einem Lipopeptid oder Lipoprotein, das N-terminal eine Dihydroxypropyl-cystein-Gruppe mit zwei esterartig gebundenen gegebenenfalls langkettigen Fettsäuren trägt.